

⑰ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication :

2 810 323

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

⑳ N° d'enregistrement national :

00 07726

⑤① Int Cl⁷ : C 07 K 5/068, A 61 K 7/42, 7/48

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 16.06.00.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 21.12.01 Bulletin 01/51.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : SHISEIDO INTERNATIONAL
FRANCE Société par actions simplifiée — FR.

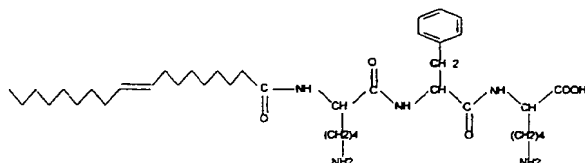
⑦② Inventeur(s) : BELLON PATRICE, BERTON ALIX,
HORNEBECK WILLIAM et BELLON GEORGES.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : RINUY SANTARELLI.

⑤④ UTILISATION COSMETIQUE D'UN LIPOPEPTIDE.

⑤⑦ L'élaïdyl-lysyl-phénylalaninyl-lysine) de formule:



procédé de préparation et compositions cosmétiques le
renfermant à titre d'agent actif.

BEST AVAILABLE COPY

FR 2 810 323 - A1



La présente invention concerne l'élaïdyl-lysil-phénylalanyl-lysine et de nouvelles compositions cosmétiques à usage topique destinées à lutter contre les altérations cutanées induites par le vieillissement chrono et photo induits (compositions anti-vieillessement).

5 On sait que le vieillissement intrinsèque (chrono-induit) ou extrinsèque (photo-induit) se caractérise par une dégénération irréversible des tissus et plus particulièrement du derme. Ces altérations sont dues à une diminution des réactions anaboliques (synthèses) et à une augmentation des réactions cataboliques (dégradations) des deux principaux constituants de la
10 matrice dermique que sont le collagène et l'élastine.

Les réactions de synthèse de la matrice dermique sont essentiellement régulées par l'action de molécules polypeptidiques : les facteurs de croissance et les cytokines.

Parmi ces peptides, le TGF β 1 est l'un des régulateurs les plus
15 importants impliqué dans les réactions de synthèse de cette matrice dermique. Il est sécrété dans la matrice par les kératinocytes et les fibroblastes sous forme latente devant être activée pour être reconnue par les récepteurs cellulaires et induire une réponse biologique (synthèse de collagène et d'élastine). Il existe 2 formes de TGF β 1 latents:

- 20 - Un petit complexe latent de TGF β 1 composé deux chaînes de TGF β chacune associées de façon non covalente à une protéine appelée « Latency Associated Protein » (LAP).
- Un grand complexe latent de TGF β 1 dans lequel le petit complexe latent de TGF β 1 est liée par la LAP de façon covalente (pont disulfure) à une autre
25 protéine appelée « Latent TGF β Binding Protein » (LTBP). Il a récemment été découvert que, dans le derme humain, ce grand complexe latent de TGF β 1 est associé à la fibrilline, molécule formant des microfibrilles elles-mêmes associées à l'élastine. Ainsi, le grand complexe latent de TGF β 1 constitue le principal réservoir cutané de TGF β 1 latent.

30 Plusieurs mécanismes physiologiques d'activation du TGF β 1 sont possibles. In vivo, le processus majeur est l'activation du TGF β 1 latent par la thrombospondine-1 (TSP-1), protéine sécrétée par les cellules dermiques.

Cette activation repose sur l'interaction entre la LAP du TGF β 1 latent et la séquence tripeptidique RFK de la TSP-1, où XFX (avec X = acide aminé basique) est la séquence minimale requise pour activer le TGF β 1 latent.

5 Au cours du vieillissement, la biodisponibilité et l'activité du TGF β 1 sont diminuées par réduction de son expression génétique et altération de sa capacité à se fixer aux récepteurs des fibroblastes. Ces modifications engendrent une diminution des réactions de synthèses des fibres d'élastine et de collagène.

10 Les réactions de dégradation de la matrice dermique sont essentiellement provoquées par l'action d'enzymes protéolytiques : les métalloprotéinases matricielles (MMPs).

Dans le cas du vieillissement chrono-induit, ce sont la MMP 1 (ou collagénase) et la MMP-2 (ou gélatinase A) secrétées par les fibroblastes du derme qui sont impliquées. Elles augmentent dans le tissu cutané âgé et
15 provoquent des altérations des fibres de collagène et d'élastine.

Pour le vieillissement photo induit, sont impliquées la MMP-9 (ou gélatinase B) et la MMP-3 (élastase leucocytaire) secrétées par les kératinocytes et/ou les polynucléaires neutrophiles lors de processus inflammatoires UV-déclenchés. Il en résulte une dégradation et une diminution
20 des fibres élastiques (élastose) et collagéniques.

Ainsi, la diminution de l'anabolisme et l'augmentation du catabolisme des macromolécules de la matrice dermique aboutit à un déséquilibre responsable de l'apparition de signes cliniques tels : atrophie cutanée, perte des propriétés mécaniques avec une perte du relief et de
25 l'élasticité, affaissement de la peau, augmentation de la profondeur des rides d'expression et formation accélérée de rides ou de stries accompagnée d'un effacement des lignes naturelles de la peau.

Afin de prévenir les altérations et les signes cliniques précédemment décrits, d'améliorer l'aspect de surface de la peau en particulier
30 en diminuant la profondeur des rides et faire disparaître les ridules, il serait donc souhaitable d'utiliser des substances capables à la fois :

- d'activer les réactions de synthèse de la matrice dermique en stimulant

l'activité du facteur de croissance TGF β 1 responsable de l'anabolisme des macromolécules de la matrice extracellulaire

- de diminuer les réactions de dégradation de la matrice dermique en modulant l'activité des métalloprotéinases responsables du catabolisme des macromolécules de la matrice extracellulaire et en protégeant ces composants contre l'action de ces enzymes.

Pour ce faire et jusqu'à ce jour, les compositions cosmétiques destinées à lutter contre le vieillissement cutané contiennent 2 types de molécules :

- 1) des molécules capables d'activer les réactions de synthèse de l'élastine et/ou du collagène, et
- 2) des molécules capables de diminuer les réactions de dégradation de cette matrice dermique.

Les molécules riches en acides aminés sous forme libre ou associées en peptides ou en protéines hydrolysées ou non sont connues pour activer la synthèse de l'élastine et/ou du collagène. Ces molécules activatrices peuvent être obtenues par synthèse, par biotechnologie à partir des levures ou du malt, ou encore, par extraction à partir de substances d'origine naturelle telles que les plantes riches en protéines de réserves (extraits de céréales telles que le blé, extraits de légumineuses telles que le soja, le lupin, le pois, extrait d'amande...) ou telles que certains dérivés animaux (lait de vache, cartilage de poisson, soie du ver...). La majorité de ces acides aminés, peptides ou protéines stimulent les synthèses dermiques simplement par effet nutritif en servant de nutriments aux fibroblastes et aux kératinocytes. Ils permettent ainsi d'augmenter l'activité anabolique globale des cellules du derme ce qui favorise, en outre, la synthèse de l'élastine et du collagène.

Cependant, ces molécules activatrices (acides aminés, peptides ou protéines) n'utilisent pas la voie spécifique du facteur de croissance TGF β 1. Elles présentent une mauvaise pénétration cutanée, une mauvaise biodisponibilité et une faible activité au sein de la peau (activité de surface essentiellement) à cause de leur haut poids moléculaire et de leur nature hydrophile. Très sensibles à la protéolyse, elles sont difficiles à formuler et

peuvent présenter des incompatibilités avec les gélifiants, les émulsionnants, les électrolytes et les pH acide ou basique des formules cosmétiques. De plus, ces molécules activatrices, qui constituent de véritables nutriments, sont particulièrement favorables au développement de micro-organismes (bactéries et levures) nécessitant le plus souvent d'augmenter la teneur en conservateurs des formules cosmétiques dans lesquelles elles sont incorporées et donc de diminuer la tolérance cutanée du produit fini.

Les facteurs de croissance ou les cytokines ne sont pas autorisés tels quels en cosmétique car ils peuvent conduire à des fibroses. Leur éventuelle utilisation se fait sous prescription et surveillance médicales.

Les molécules antiradicalaires, les molécules anti-glycation et les molécules inhibitrices des métalloprotéinases matricielles sont connues pour diminuer les réactions de dégradation de la matrice dermique.

Les molécules antiradicalaires, qui inhibent la formation des radicaux libres, sont le plus souvent des agents antioxydants non enzymatiques (vitamine E, vitamine C, caroténoïdes, tocophérols, flavonoïdes, composés phénoliques, oligo-éléments tel que le sélénium...) ou des agents antioxydants enzymatiques (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase...). Utilisés à des doses incorrectes ou trop importantes, ces agents actifs antiradicalaires peuvent présenter des effets pro-oxydant et pro-radicalaire qui aggravent le vieillissement cutané et ses signes cliniques.

Les actifs anti-glycation sont en général des protéines telles que celles décrites précédemment et qui servent de leurre à la place des lipoprotéines membranaires, mais qui présentent les inconvénients cités plus haut.

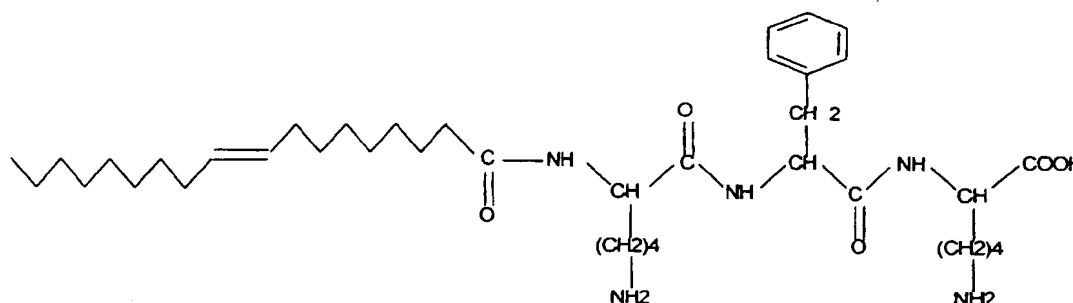
Les molécules inhibitrices des métalloprotéinases matricielles sont également le plus souvent des protéines telles que décrites précédemment avec les inconvénients qui en découlent. Elles peuvent aussi se présenter sous forme d'acides gras telles que décrites dans EP-A-0 985 409 ("Utilisation en cosmétique d'acides gras") sans présenter les inconvénients des protéines.

Après de longues recherches, la demanderesse a trouvé que de nouveaux lipopeptides dans lesquels la chaîne grasse renferme de 16 à 20

atomes de carbone et comprenant de 1 à 3 et de préférence 1 double liaison combinaient les deux sortes de propriétés désirées. Elle a en particulier trouvé un nouveau composé de type lipopeptidique qui présente à la fois :

- la propriété d'activer les réactions de synthèse de la matrice dermique par stimulation spécifique de l'activité du facteur de croissance TGFβ1 responsable de l'anabolisme des macromolécules de la matrice extracellulaire
- la propriété de diminuer les réactions de dégradation de la matrice dermique par inhibition des métalloprotéinases matricielles et protection des composants de la matrice dermique contre l'action de ces enzymes.

La présente demande a pour objet l'élaïdyl-lysyl-phénylalananyl-lysine de formule :



- appelé ci-après élaïdyl-KFK, produit nouveau présentant une remarquable activité comme agent cosmétique destiné à lutter contre les signes du vieillissement cutané.

La présente invention a encore pour objet un procédé de préparation de l'élaïdyl-lysyl-phénylalananyl-lysine caractérisé en ce que l'on fait réagir l'acide élaïdique avec la lysyl-phénylalananyl-lysine ou successivement la lysine, la phénylalanine et la lysine, éventuellement et de préférence sous forme protégée.

La présente invention a aussi pour objet une composition cosmétique, caractérisée en ce qu'elle renferme l'élaïdyl-lysyl-phénylalananyl-lysine à titre de principe actif.

Les compositions anti-vieillessement selon l'invention comprennent l'élaïdyl-lysyl-phénylalananyl-lysine, de préférence dans un support cosmétique

contenant une phase grasse, en particulier de type émulsion.

En plus du lipopeptide élaïdyl-KFK, les compositions cosmétiques anti-vieillessement selon l'invention peuvent contenir d'autres agents actifs anti-vieillessement ou antirides comme des agents antiradicalaires (tocophérols, vitamine E, vitamine C, caroténoïdes, flavonoïdes, composés phénoliques, sucres ou oligo-éléments tels que le sélénium ...), des composés anti-glycation, des α -hydroxy-acides ou des β -hydroxy-acides.

Les compositions cosmétiques anti-vieillessement selon l'invention peuvent contenir des agents actifs raffermissants ou tenseurs tels que des protéines végétales de soja ou de blé, des extraits d'algues riches en acides aminés ou des dérivés de silicium.

Les compositions cosmétiques anti-vieillessement selon l'invention peuvent aussi contenir des agents actifs hydratants tels que l'acide hyaluronique, la chitine ou le chitosane, l'urée, les acides aminés, l'acide lactique et ses sels, le PCNa, la glycérine, le sorbitol ou des dérivés de silicium.

Les compositions cosmétiques anti-vieillessement selon l'invention peuvent encore contenir d'autres des corps gras susceptibles de contribuer à la reconstitution du film hydrolipidique de la peau : huiles végétales riches en acides gras essentiels, phospholipides, céramides.

Les compositions cosmétiques anti-vieillessement selon l'invention peuvent également contenir des filtres solaires UVB et UVA tels que l'octylméthoxycinnamate, le butyl méthoxy dibenzoylméthane, les benzophénones ou des pigments minéraux photoprotecteurs tels que le dioxyde de titane ou l'oxyde de zinc enrobés ou non.

Les compositions cosmétiques anti-vieillessement selon l'invention peuvent tout autant comprendre des adjuvants cosmétiques classiques choisis parmi les corps gras (acides gras, alcool gras, esters d'acides gras, les huiles végétales ou minérales ou de synthèse, les huiles siliconées volatiles ou non, les huiles fluorées ou perfluorées..), les solvants organiques (alcool et polyols), les épaississants (acides polyacryliques, les gommes, les dérivés cellulotiques), les stabilisants, les émollients, les silicones, les parfums, les conservateurs, les colorants, les tensioactifs, les charges, les propulseurs ou

tout autre ingrédient utilisé en cosmétique en particulier pour la fabrication d'émulsions.

L'élaïdyl-KFK peut être fabriqué par synthèse en phase solide selon une stratégie Fmoc utilisant une résine chlorotriptyl et des groupements protecteurs par exemple de type t-butyl. Le produit est ensuite détaché de la
5 résine par 0,5% d'acide trifluoro-acétique dans du chlorure de méthylène, puis il est déprotégé par addition d'acide chlorhydrique 4N dans du dioxane. La pureté du lipopeptide élaïdyl-KFK ainsi obtenu déterminée par HPLC est de 95% et son poids moléculaire est égal à 685,9.

10 Les compositions cosmétiques selon l'invention sont préférentiellement des émulsions eau dans huile ou huile dans eau et contiennent de 0,001% à 10 % en poids de lipopeptide élaïdyl-KFK décrit ci dessus avec de préférence entre 0,1 et 5% en poids par rapport au poids total de la composition.

15 Les compositions peuvent être préparées selon les techniques connues de fabrication des émulsions huile-dans-eau ou eau-dans-huile. Elles peuvent se présenter de préférence sous forme d'émulsion simple ou complexe (H/E/E, E/H/E) telle qu'un lait, une crème, un gel ou un gel-crème, une pommade ou un bâtonnet solide, sous forme de microémulsion ou de
20 nanoémulsion ou suspension ou de dispersion dans des solvants ou des corps gras, sous forme de mousse ou de spray et peuvent être conditionnées en spray.

L'élaïdyl-KFK et les compositions cosmétiques selon l'invention présentent notamment des propriétés anti-vieillessement par :

- 25 a) Stimulation de la synthèse des constituants de la matrice épidermique par :
- Activation du TGFβ1 latent épidermique
 - Augmentation de la teneur en facteur de croissance TGFβ1 épidermique
 - Stimulation de la synthèse des composants protéiques et collagéniques de la matrice dermique
- 30 b) Inhibition des métalloprotéinases matricielles (MMP-2 et MMP-9) et protection des composants de la matrice dermique contre l'action de ces enzymes.

Ce rééquilibrage entre synthèse et catabolisme des principales

macromolécules de la matrice extracellulaire que sont le collagène et l'élastine permet de réduire visiblement et de prévenir les signes du vieillissement. La peau présentant des signes de vieillissement retrouve sa tonicité et son relief, la profondeur des rides est diminuée, et les ridules disparaissent. L'apparition des
5 ridules et rides lors d'expositions solaires est diminuée, la peau conserve son état de surface, sa tonicité et son relief au cours du temps.

Le nouveau lipopeptide et les compositions selon l'invention peuvent donc être utilisés pour la prévention et/ou le traitement des signes du vieillissement photo ou chrono induit de la peau du visage et du corps (anti-ride,
10 tonifiant, lissant, raffermissant, qui améliore l'état de surface et l'élasticité de la peau...).

De par les propriétés décrites précédemment, on peut aussi envisager l'incorporation de ce lipopeptide dans des compositions solaires pour le visage et le corps, dans des compositions protectrices de jour et de nuit vis à
15 vis de la pollution ou de la fumée.

Le lipopeptide élaïdyl-KFK selon l'invention agit par voie naturelle puisqu'il active le TGF β 1 latent qui existe naturellement dans la peau (utilisation du potentiel endogène de la peau).

Du point de vue pratique, le lipopeptide élaïdyl-KFK peut être
20 incorporé facilement dans toute composition cosmétique comportant une phase grasse. Sa stabilité est bonne au cours du temps, vis à vis des pH acides ou basiques, de l'oxygène, de l'eau ou des électrolytes. Elle ne présente pas d'incompatibilité vis à vis des adjuvants cosmétiques classiques cités précédemment (corps gras, solvants organiques, épaississants, stabilisants,
25 émoullients, silicones, parfums, conservateurs, colorants, tensioactifs, charges, propulseurs) ou tout autre ingrédient utilisé en cosmétique en particulier pour la fabrication d'émulsions.

Sa partie acide gras, lipophile, lui confère une résistance à la protéolyse et une compatibilité vis à vis de la barrière l'épiderme elle-même
30 lipophile (amélioration de la pénétration épidermique).

Sa partie protéique, hydrophile, favorise sa biodisponibilité au sein de la matrice dont les constituants sont eux aussi essentiellement hydrophiles.

La figure 1 représente la cinétique d'activation du TGF β 1 latent en fonction de la quantité de lipopeptide ; les abscisses représentant la durée d'incubation en heures et les ordonnées l'activité TGF β 1 exprimée en pg/puits.

La figure 2 représente la stimulation de la synthèse des composants protéiques et collagéniques de la matrice dermique induite par le lipopeptide. Le tableau A représente la synthèse protéinique totale et le tableau B la synthèse de collagène total. Les ordonnées sont exprimées en coups par minute par μ g d'ADN.

Les exemples qui suivent illustrent la présente invention.

10

Exemples de réalisation

Exemple 1 : Crème de jour antirides sous forme d'émulsion H/E.

Cette crème est obtenue comme suit :

Phase A	Octyl hydroxystéarate	5 g
	Propylène glycol-15 stéaryl éther	5 g
	Glycéryl stéarate	2 g
	MYRJ 49®	1,8 g
	Lipopeptidique élaïdique- KFK	1g
	Acide cis-parinarique	1 g
	Parabens	qs
Phase B	Eau	qs
	Glycérine	3 g
	Butylène glycol	2 g
	Adjuvants (butyl hydroxytoluène, colorants, EDTA)	qs
Phase C	SEPIGEL 305®	2 g
Phase D	parfum	qs

- 15 MYRJ® 49 : émulsionnant commercialisé par la société ICI
 SEPIGEL® 305 : gélifiant commercialisé par la société SEPPIC
 qs : quantité suffisante

Mode opératoire :

On chauffe la phase A à 80°C. On chauffe la phase B à 80°C. On incorpore la phase A dans la phase B et on refroidit à 45°C sous agitation. On ajoute alors la phase C puis la phase D.

5

Exemple 2 : Crème contour des yeux antirides sous forme d'émulsion H/E.

Cette crème est obtenue comme suit :

Phase A	MONTANOV® 68	5 g
	Lipopeptide élaïdyl-KFK	0,05g
	Isostéarate d'isostéaryle	3 g
	DOW CORNING 556	3 g
	Stéaryl heptanoate et stéaryl caprylate	3 g
	Parabens	qs
Phase B	Eau	qs
	Gomme xanthane	0,3 g
Phase C	Adjuvants (butyl hydroxytoluène, colorants, EDTA)	qs
	Protéine de soja	1 g
	Vitamine E acétate	0,1 g
	parfum	qs

MONTANOV® 68 : émulsionnant commercialisé par la société SEPPIC

10 DOW CORNING® 556 : huile siliconée commercialisée par la société DOW CORNING

Mode opératoire :

On chauffe la phase A à 80°C. On chauffe la phase B à 80°C. On incorpore la phase B dans la phase A et on refroidit à 45°C sous agitation. On

15 ajoute alors la phase C.

Exemple 3 : Lait solaire sous forme d'émulsion H/E

Ce lait est obtenu comme suit :

Phase A	Octyl méthoxycinnamate	5 g
	Diméthicone	3 g
	Lipopeptide élaïdyl-KFK	0,03g
	Huile minérale	2 g
	BRIJ 721	1,5 g
	ARLATONE 983S	1,5 g
	Parabens	qs
Phase B	Eau	qs
	Glycérine	5 g
	Butylène glycol	4 g
	Adjuvants (BHT, colorants, EDTA)	qs
Phase C	SEPIGEL 305®	2 g
Phase D	parfum	qs

SEPIGEL® 305 : gélifiant commercialisé par la société SEPPIC

5 BRIJ® 721 : émulsionnant commercialisé par la société ICI

ARLATONE® 983S (et non 938) : émulsionnant commercialisé par la société ICI

Mode opératoire :

- On chauffe la phase A à 80°C. On chauffe la phase B à 80°C. On
- 10 incorpore la phase B dans la phase A et on refroidit à 45°C sous agitation. On ajoute la phase C puis la phase D.

Exemple 4 : Préparation de l'élaïdyl-KFK

- On a préparé l'élaïdyl-KFK par synthèse en phase solide selon
- 15 une stratégie Fmoc utilisant une résine chlorotrityl et des groupements protecteurs par exemple de type t-butyl. Le produit est ensuite détaché de la résine par 0,5% d'acide trifluoro-acétique dans du chlorure de méthylène, puis il est déprotégé par addition d'acide chlorhydrique 4N dans du dioxane. La pureté du lipopeptidel'élaïdyl-KFK ainsi obtenu déterminée par HPLC est de 95% et
- 20 son poids moléculaire est égal à 685,9.

Expérimentation 1. Activation du TGFβ1 latent et augmentation de la quantité en facteur de croissance TGFβ1 induites par l'élaïdyl-KFK

Des puits de plaques ELISA ont été recouvertes d'anticorps monoclonaux anti-LAP (800 ng/puits) dans un tampon carbonate à 25 mM (pH 9,6), pendant 18 heures à 4°C. Après rinçage, le TGFβ1 latent (sous forme de petit complexe TGFβ1-LAP) a été ajouté à 20 mM dans un tampon tris-HCl contenant 50 mM de NaCl (pH 7,6, pendant 2 heures à température ambiante). La quantité de TGFβ1 latent liée aux anticorps anti-LAP a été déterminée par méthode ELISA. Dans ces conditions expérimentales, 5,25 ng de TGFβ1 latent étaient liés dans chaque puits, correspondant à 1,25 ng de TGFβ1 actif. Un contrôle par traitement à l'acide a permis de libérer 660 pg/puits de TGFβ1 actif. L'élaïdyl-KFK a été ensuite ajouté à différentes concentrations en tampon DPBS (pH 7,4, à 37°C pendant différents temps). La quantité de TGFβ1 libéré actif a été alors déterminée par ELISA (anticorps TGFβ1 E max TM ImmunoAssay System fourni par Promega, France).

Résultats :

La quantité de TGFβ1 actif générée par l'élaïdyl-KFK est significative, ce à partir de 7,5 μM de lipopeptide. Elle est ensuite proportionnelle à la concentration en lipopeptide jusqu'à 10 heures d'incubation (activation maximale). A 75 μM, le lipopeptide génère 90 pg de TGFβ1 actif correspondant à 36% de la totalité du TGFβ1 latent activable (voir figure 1).

Expérimentation N° 2 : Stimulation de la synthèse des composants protéiques et collagéniques de la matrice dermique induite par le l'élaïdyl-KFK

Les fibroblastes humains ont été cultivés dans des plaques 24 puits. A confluence, les cellules ont été incubées en présence de TGFβ1 latent et/ou de l'élaïdyl-KFK (10 μM) pendant 72 heures. Le milieu de culture était composé de supplément DMEM à 0,5% de FCS, de 50 μg/ml de β-aminopropionitrile, de 10 μg/ml d'acide sorbique, de 23 μg/ml de proline et de 5 μCi/ml de [3H]-proline. Le milieu de culture et les cellules en monocouche

étaient collectées séparément à la fin de la période d'incubation et des aliquotes ont été prélevés pour effectuer les mesures d'ADN. Le dosage des protéines et du collagène cellulaires a été effectué selon la méthode décrite par Petrkokski et Diegelman (1971, « the use of a mixture of protéinase free
5 collagenases for the specific essay of radioactive collagen in the presence of other proteins », Biochemistry 10 :988-994).

Résultats :

En présence de TGF β 1 latent, l'élaïdyl-KFK stimule la synthèse
10 des protéines totales (augmentation de 50% des protéines du milieu de culture) et du collagène. Il a également été démontré que le lipopeptide stimule la synthèse de lamiline-5, protéine essentielle retrouvée au niveau de la jonction dermo-épidermique (voir figure 2).

15 Expérimentation 3 : Inhibition des métalloprotéinases matricielles et protection des composants de la matrice dermique contre l'action de ces enzymes par l'élaïdyl-KFK.

Les coupes mises en œuvre étaient des coupes de congélation de 8 μ m d'épaisseur, sériées, de peau humaine provenant de prépuces.

20 L'effet inhibiteur des métalloprotéinases a été déterminée de la façon suivante : Les enzymes testées étaient la MMP-2 (activité sur le collagène) et la MMP-9 (activité sur l'élastine). L'enzyme sous forme activée a été incubée pendant 15 minutes avec différentes concentrations d'élaïdyl-KFK, puis la solution contenant l'enzyme et l'inhibiteur a été déposé sur la coupe de
25 peau humaine et incubée 4 à 18 heures à 37°C en atmosphère humide. A la fin de l'incubation, les coupes ont été colorées avec des colorants spécifiques. Le colorant de l'élastine est la fushine-catéchine polyphénolique.

L'effet protecteur de la matrice extracellulaire vis à vis des métalloprotéinases a été déterminée de la façon suivante : les lames portant les
30 coupes de peau ont été incubées sous agitation douce pendant 4 heures dans l'éthanol pur contenant le lipopeptide à la concentration désirée. Puis les coupes ont été rincées et séchées. L'enzyme a alors été déposée sur la coupe,

la lame a été mise à incuber en atmosphère humide à 37°C pendant 4 à 18 heures. A la fin de l'incubation, les lames ont été colorées avec les colorants spécifiques de l'élastine ou des collagènes mentionnées plus haut.

- 5 Les résultats sont quantifiés par un système morphométrique automatisé. Les lames sont observées sous microscope équipé d'une caméra. Les images générées ont été converties en niveaux de gris correspondant aux composants à étudier. Un programme spécifique a ensuite permis de calculer la surface relative occupée par les fibres élastiques et les trousseaux collagéniques, leur aire et le volume occupés par ceux-ci.

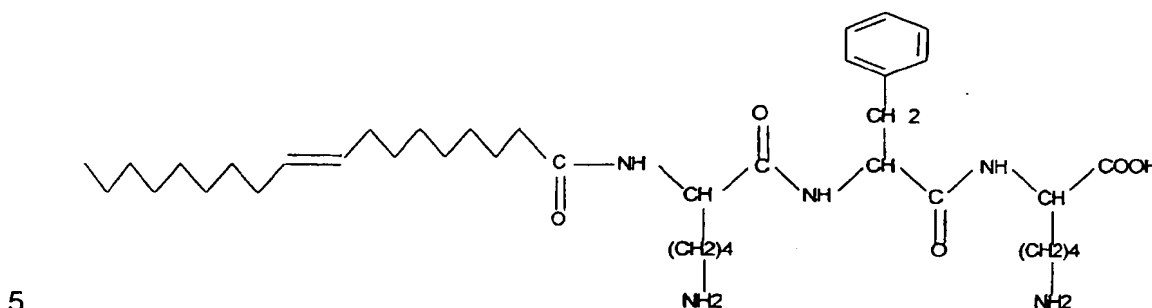
10

Résultats :

	Elaidyl-KFK	MMP-2	MMP-9
Effet inhibiteur	1 μ M	54%	33%
	10 μ M	67%	79%
Effet protecteur	1 μ M	52%	84%
	10 μ M	78%	90%

REVENDICATIONS

1. L'élaidyl-lysyl-phénylalanyl-lysine) de formule :



2. Un procédé de préparation de l'élaidyl-lysyl-phénylalanyl-lysine caractérisé en ce que l'on fait réagir l'acide élaidique avec la lysyl-phénylalanyl-lysine ou successivement la lysine, la phénylalanine et la lysine, éventuellement sous forme protégée.

10

3. Une composition cosmétique caractérisée en ce qu'elle renferme l'élaidyl-lysyl-phénylalanyl-lysine à titre d'agent actif et un excipient.

4. Une composition selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle comprend une phase grasse dans l'excipient.

15 5. Une composition selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle comprend une émulsion huile dans eau ou eau dans huile.

6. Une composition selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une crème.

20 7. Une composition selon l'une quelconque des revendications 3 à 6, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une composition solaire.

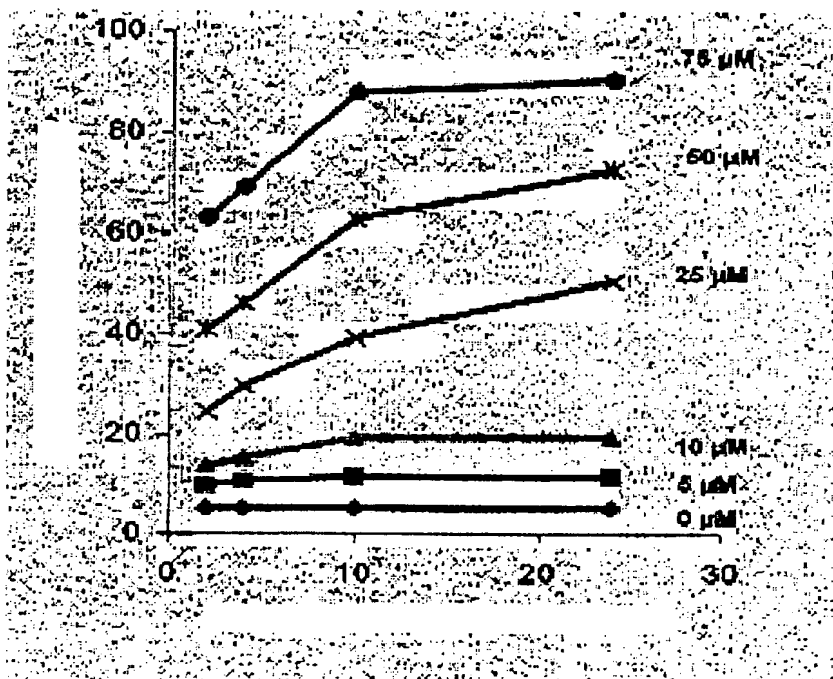


FIGURE 1

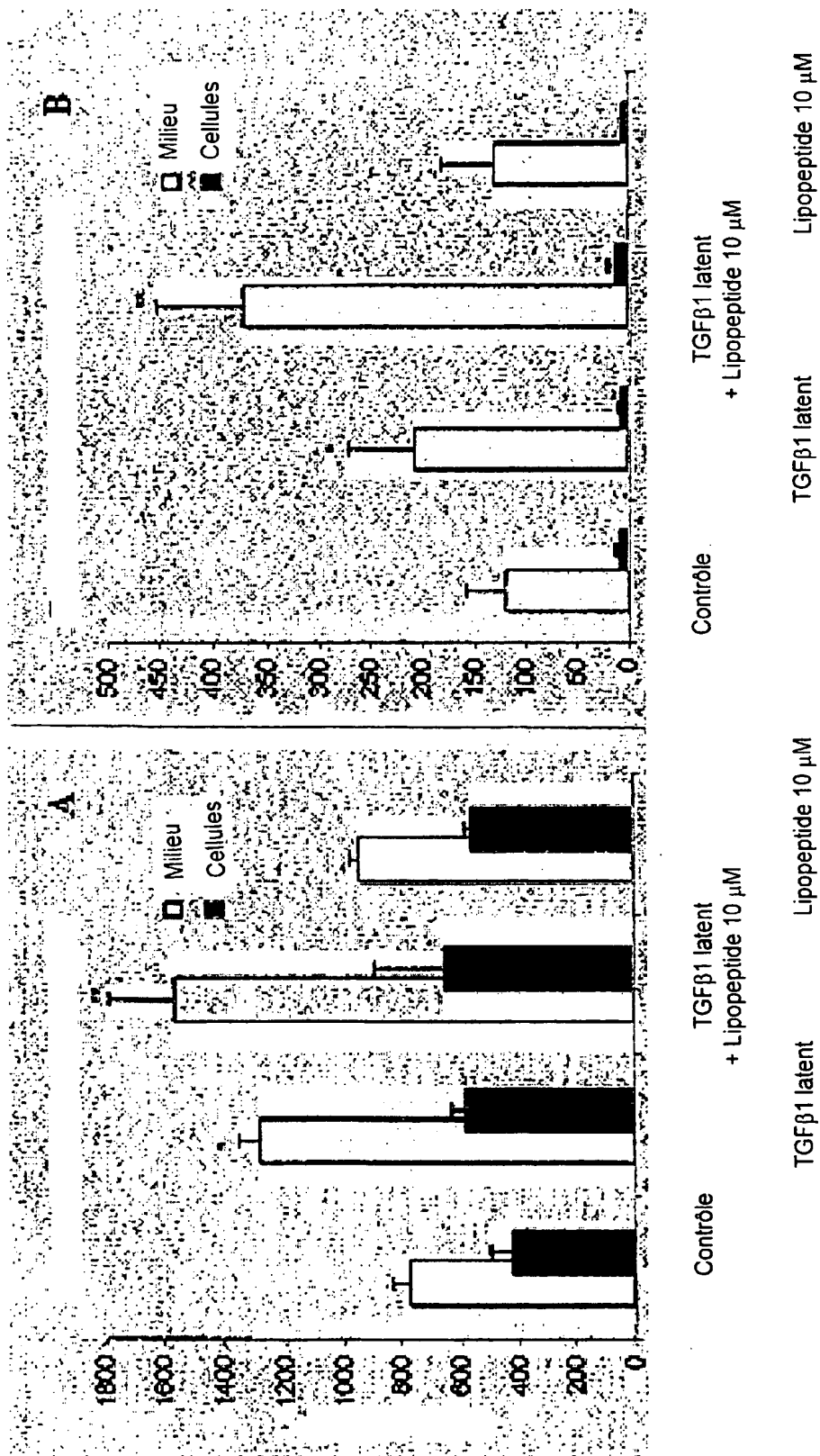


FIGURE 2

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.